

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻
平成 23 年度博士課程 入学
氏 名 青山 晋也
指導教員名 加藤 久典

論文題目

生活習慣病と筋萎縮に対するフラボノイドの予防機能およびその作用機構に関する研究

近年の食生活の乱れや運動不足、高齢化に伴い、生活習慣病（メタボリックシンドローム）や運動器の障害（ロコモティブシンドローム）が急増している。これらは認知症とともに、「健康寿命の短縮」、「寝たきりや要介護状態」の三大要因であり、その予防・改善は超高齢化社会を迎えた我が国において最重要課題といえる。機能性食品は食物に含まれる有効成分を意識して摂取することにより健康増進を目指すものであり、高齢者の健康増進への期待は大きい。植物の二次代謝産物であるフラボノイドには生理活性を有するものが多く、生活習慣病に対する健康効果について数多く研究されている。しかし、その詳細かつ広範な生理応答および作用機構、また運動器の障害に対する効果については十分に解明されていない。そこで、本研究では特に高齢者の健康に着目し、フラボノイドの生活習慣病および運動器の障害のひとつとして筋萎縮に及ぼす影響とその作用機構を解析した。

第1章 フラボノイドが生活習慣病モデル動物に与える影響

高脂肪食モデルおよび西洋型食モデル（高脂肪・高コレステロール・高スクロースといった多因子により代謝異常を引き起こす餌）を用いて、フラボノイド摂取が生活習慣病モデル動物の代謝異常に及ぼす影響およびその生理応答について検討を行った。

フラボノイド摂取が高脂肪食誘導性代謝異常に及ぼす影響

8週齢雄性 C57BL/6J マウスに通常食（10% kcal fat）、高脂肪食（45% kcal fat）および高脂肪食に各種フラボノイド（0.05%ゲニステイン、0.05%ダイゼイン、0.1%ケルセチン）を添加したものをそれぞれ給餌し20週間飼育した。20週間の高脂肪食摂取は、通常食に比べ肥満および耐糖能異常（糖負荷試験）、インスリン抵抗性（インスリン負荷試験）、高コレステロール血症、脂質過酸化（TBARS）を指標とした際の酸化ストレスの誘導等が認められた。フラボノイドを添加した高脂肪食摂取は、血清 TBARS を有意に減少させ、フラボノイドによる抗酸化作用が認められた。またケルセチンは、肝臓中 TBARS も有意に低下させた。高脂肪食摂取により誘導された酸化ストレスは炎症を引き起こし、代謝疾患を増悪化することが報告されているが、肥満や糖代謝・脂質代謝に関しては、フラボノイドによる顕著な効果は認められなかった。したがって、フラボノイドの摂取は高脂肪食摂取による酸化ストレスの増加に対して抑制作用を示すが、糖・脂質代謝異常に対する作用は弱いことが明らかとなった。

ケルセチン摂取が西洋型食誘導性代謝異常に及ぼす影響

8週齢雄性 C57BL/6J マウスに通常食（AIN-93G）、西洋型食（40% kcal fat、0.15%コレステロール、34%スクロース）およびケルセチンを0.1%添加した西洋型食を給餌し、8週間飼育した。ケルセチンの摂取は、西洋型食による糖負荷およびピルビン酸負荷後の血糖値上昇を有意に抑制し、耐糖能異常改善や糖新生亢進抑制作用を示した。DNA マイクロアレイによる肝臓での網羅的遺伝子発現解析により、ケルセチン摂取は解糖系律速酵素（*Pfkfb*）の発現を増加させ、糖新生律速酵素（*Pck2*）の発現を低下させることが明らかとなり、解糖系亢進および糖新生抑制作用が示唆された。Ingenuity Pathway Analysis を用いて、西洋型食およびケルセチン摂取により顕著に変動したパスウェイを抽出した結果、Estrogen-mediated S-phase entry pathway が挙がった。このパスウェイに含まれる遺伝子群は西洋型食摂取により発現減少していたのに対し、ケルセチンの摂取によりほぼすべての発現が増加した。また、西洋型食摂取により最も発現増加を示した *Nme1* はケルセチン摂取により抑制されていた。これら遺伝子の発現は p53 により調節されていることが知られており、西洋型食摂取およびケルセチン摂取は p53 を介して多くの遺伝子発現を制御

していることが考えられた。一方、メタボローム解析の結果より、ケルセチンの摂取はグルタチオン代謝を活性化する傾向にあることが明らかとなった。グルタチオンは抗酸化ペプチドであり、耐糖能異常改善作用も報告されている。以上の結果より、ケルセチンの摂取は西洋型食による耐糖能異常や糖新生亢進を改善し、その作用機構として p53 の活性変動および抗酸化作用を介していることが考えられた。

第2章 フラボノイドが筋萎縮モデル動物に与える影響

ゲニステインおよびケルセチン摂取が筋萎縮に及ぼす影響について、坐骨神経切除による廃用性筋萎縮モデルを用いて検討を行った。

10 週齢雄性 Wistar ラットを通常食群、0.05%ゲニステイン添加食群および 0.1%ケルセチン添加食群に分け、24 日間飼育した。14 日目に片肢の坐骨神経を切除し、筋萎縮を誘導した。もう片方の肢には偽手術を施した。筋萎縮は偽手術肢に対する神経切除肢の筋重量比で評価した。ゲニステインおよびケルセチンの摂取は坐骨神経切除によるヒラメ筋の萎縮を有意に抑制した。また、筋萎縮時に誘導されるユビキチンリガーゼである *Atrogin1* や *Murf1* の遺伝子発現もゲニステインおよびケルセチン摂取により抑制された。これら 2 つの遺伝子発現誘導を制御する因子を萎縮ヒラメ筋での網羅的遺伝子発現解析により探索した結果、ゲニステインでは *Foxo1* が候補因子として挙げた。また、ゲニステイン摂取によりエストロゲン受容体 (ER) の標的遺伝子が多数変動していた。筋萎縮の誘導によりエストロゲン受容体 α (ER α) は発現上昇を、ER β は発現減少を示すことが明らかとなり、萎縮筋においてゲニステインのエストロゲン受容体への結合能の変化が筋萎縮抑制作用に働いていることが示唆された。一方、ケルセチンの摂取により、*Atrogin1* および *Murf1* の制御因子である *Ikkb* (IKK β) の発現抑制や Akt のリン酸化亢進がみられた。また、IKK β は酸化ストレスにより活性化され、筋萎縮の発症に関与することが明らかとなっているが、ケルセチンの摂取は血中 TBARS 濃度を減少させ、酸化ストレスの軽減が認められた。したがってケルセチン摂取は *Ikkb* の発現抑制や Akt のリン酸化、抗酸化作用を介して筋萎縮抑制作用を示していることが示唆された。

第3章 ゲニステイン摂取による筋萎縮予防効果の作用機構解析

第2章の結果より、ゲニステイン摂取が萎縮筋でのエストロゲン受容体の標的遺伝子を多く変動させていることが明らかとなった。そこで、ゲニステインの筋萎縮抑制作用へのエストロゲン受容体の関与について、Selective Estrogen Receptor Modulators (SERM)

を用いて検討した。

最初に、ゲニステインの筋萎縮抑制作用がエストロゲン受容体アンタゴニスト (ICI 182, 780) 存在下で消失するかの検討を行った。10 週齢雄性 C57BL/6J マウスに ER アンタゴニスト (1 mg/kg b.w./day) を浸透圧ミニポンプにより皮下投与し、第 2 章と同様に 24 日間飼育した。アンタゴニスト存在下では坐骨神経切除によるヒラメ筋萎縮の抑制作用は消失し、*Atrogin1* や *Murf1* の発現誘導抑制作用も消失した。このことからゲニステインによる筋萎縮抑制作用にはエストロゲン受容体が関与していることが示された。次に、筋萎縮に関与しているエストロゲン受容体アイソフォームについて検討を行うため、10 週齢雄性 C57BL/6J マウスに SERM を浸透圧ミニポンプにより皮下投与した。3 日後、坐骨神経切除により 10 日間筋萎縮を誘導した。ER α アゴニスト (PPT; 1 mg/kg b.w./day) の投与は坐骨神経切除による筋萎縮を抑制し、*Atrogin1* や *Murf1*、*Foxo1* の遺伝子発現の誘導を抑制した。一方 ER β アゴニスト (DPN; 1 mg/kg b.w./day) の投与は筋萎縮を抑制しなかった。以上の結果より、ゲニステインは ER α を介して筋萎縮を予防していることが明らかになった。

総括

本研究では、高齢者の健康の主要な阻害因子である生活習慣病および運動器の障害に着目し、フラボノイドの予防効果、その作用機構の解析を行った。

生活習慣病に対する作用に関しては、ケルセチンは西洋型食摂取による糖代謝異常を改善し、解糖系および糖新生律速酵素の発現変動や抗酸化作用の関与が考えられた。一方、網羅的遺伝子発現解析により Estrogen-mediated S-phase entry pathway 関連因子や *Nme1* の遺伝子発現は西洋型食およびケルセチン摂取により著しく変動し、西洋型食による作用をケルセチンが強く打ち消した因子であった。今後、ケルセチン摂取によるこれらの因子の制御機構およびその生理作用への関与についての検討が期待される。

運動器の障害に関しては、フラボノイドの新たな機能として、ゲニステインおよびケルセチン摂取による廃用性筋萎縮抑制作用が明らかとなった。ゲニステインはその作用機構として ER α を介しており、ケルセチンは抗酸化作用が関与していることが示唆された。今後、ゲニステイン摂取によるエストロゲン受容体を介した制御機構、またケルセチン摂取により変動の認められた因子の筋萎縮抑制作用への関与を明らかにしていく必要がある。